Archive of SID

مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۹، شماره‌ی ۷۵، تابستان ۱۳۹۰، صفحات ۲۵ تا ۳۶

مقایسه‌ی میزان تقارب الگوی‌های ژنتیکی سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از تکنیک MIRU-VNTR جدا شده از بیماران مسلول در سال‌های ۸۵ تا ۸۶

مهدی جعفریان[۱]، دکتر پریسا فرنیا[۲]، محدثه مظفری[۳]، مجتبی احمدی[۴]، دکتر محمد رضا مسجدی[۵]، دکتر علی اکبر ولایتی[۶]

نویسنده‌ی مسئول: تهران، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی mehdijafariandormency@gmail.com

دریافت: ۸۹/۳/۲۲ پذیرش: ۸۹/۱۰/۲۷

چکیده

مقدمه: *در دهه‌های اخیر، اپیدمیولوژی اهمیت ویژه‌ای در مطالعات بهداشتی و کنترل بیماری‌ها پیدا کرده، به‌طوری‌که برنامه‌ها و سیاست‌های بهداشتی دهه‌های اخیر را تحت نفوذ خود قرار داده است. امروزه با بررسی تقارب الگوی‌های ژنتیکی سویه‌های بیماری‌زا می‌توان به وجود منابع عفونی مشترک در بین بیماران پی‌برد. هدف در این مطالعه مقایسه‌ی میزان تقارب الگوهای ژنتیکی جدا شده از بیماران مسلول سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از تکنیک MIRU-VNTR بود.*

روش بررسی: *پس از جداسازی نمونه‌ها از محیط کشت لونشتاین جانسون و قرار دادن تست‌های افتراقی و حساسیت دارویی (به روش تناسبی)، استخراج DNA سویه‌ها به روش CTAB/Nacl صورت گرفت. الگوی ژنتیکی سویه‌ها بر اساس فرمت ۱۲ لوکوسی تکنیک MIRU-VNTR محاسبه گردید. برای بررسی‌های اپیدمیولوژی از اطلاعات کلاسیک و مولکولار بیماران استفاده گردید.*

یافته‌ها: *از ۱۴۰ نمونه‌ی مورد مطالعه قرار گرفته، پس از قرار دادن تست‌های حساسیت دارویی ۶۵ (۶۴/۴ درصد) مورد از نمونه‌ی سل مقاوم به دارو، ۲۹ مورد (۲۰/۷ درصد) از نمونه‌ها سل غیر مقاوم به دارو و باقیمانده‌ی آن‌ها را سویه‌های حساس به دارو تشکیل دادند. آنالیز الگوهای ژنتیکی سویه‌ها نیز نشان داد که خانواده‌های دهلی/کس با ۴۹ مورد (۳۵ درصد)، اوگاندا I با ۲۸ مورد (۲۰ درصد)، نیو I با ۱۶ مورد (۱۱/۴ درصد) بیشترین و خانواده‌های EAI با ۱ مورد (۰/۷ درصد)، هارلم با ۳ مورد (۲/۱ درصد) و H37Rv با ۵ مورد (۳/۵ درصد) کمترین الگوی ژنتیکی خانواده‌ها را به خود اختصاص داده بودند.*

نتیجه‌گیری: *مقایسه‌ی تقارب الگوهای ژنتیکی نشان داد بیشترین تعداد و تنوع الگوهای ژنتیکی در استان تهران مربوط به منطقه‌ی جنوبی (که از قسمت جنوب تهران تا منطقه‌ی میدان آزادی) و در سطح کشور نیز مربوط به شهرهای مرزی کشور که همجوار با کشورهای افغانستان، عراق، ترکمنستان و همچنین شهرهای با درصد بالای مهاجرپذیری مشاهده گردیده است که نشان از وجود منابع آلوده مشترک بین بیماران می‌باشد.*

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، MIRU-VNTR، اپیدمیولوژی

۱- کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، باشگاه پژوهشگران جوان
۲- دکترای میکروبیولوژی پزشکی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات پزشکی بهداشتی درمانی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی
۴- کارشناس میکروب‌شناسی، آزمایشگاه رفرانس سل کشوری، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی
۵- فوق تخصص ریه، استاد دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی
۶- فوق تخصص عفونی اطفال، استاد دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سل یکی از بیماری‌های عفونی کشنده برای انسان می‌باشد. امروزه پیدایش سویه‌های XDR (Extensive Drug Resistance) و TDR (Totaly Drug Resistance) علاوه بر MDR (Multi Drug Resistance) مشکلات جدی را در برابر کنترل برنامه‌ی سل در سطح جهان مطرح کرده است (۱). انگشت نگاری از سویه‌ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران می‌تواند برای تعیین انتشار اخیر بیماری در یک جامعه و همچنین بررسی علل فاکتورهای خطرساز برای انتشار مورد استفاده قرار گیرد (۲). اگر چه تاکنون تعداد زیادی روش، برای مطالعات انگشت نگاری DNA سویه‌ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ارایه شده است، اما تنها تعدادی معدودی از آن‌ها برای مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی مناسب می‌باشند (۳). امروزه روش‌هایی که برای مطالعات اپیدمیولوژی استفاده می‌شود، روش‌های است که بر پایه‌ی PCR استوار می‌باشد. (۴) یکی از این تکنیک‌ها، تکنیکی است که بر روی توالی‌های تکراری پشت سر هم [VNTR (Variable Number Tandem Repeat)] که بر روی ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پراکنده است (MIRU-VNTR) صورت می‌گیرد (۵). MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit) توالی‌های در حدود ۴۰ تا ۱۰۰ bp (Base Pair) است که به تعداد و توالی‌های مختلف روی مکان‌های معین در روی ژنوم مایکوباکتریوم قرار دارند. تاکنون ۴۱ مورد توالی MIRU بر روی ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه‌ی H37Rv مشخص شده است (۶). مزیت استفاده از این تکنیک جدید در مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی، نسبت به تکنیک های دیگر در این است که با استفاده از یک PCR ساده می‌توان الگوی‌های ژنتیکی را در یک منطقه، مورد مطالعه قرار داد و نیز مشکلاتی از قبیل تهیه‌ی کیت‌های تجاری، کمبود مقدار DNA جدا شده از نمونه‌های مورد مطالعه و صرف هزینه‌های سنگین و اختصاص زمان‌های طولانی برای این‌گونه مطالعات اپیدمیولوژی وجود نخواهد داشت (۳) هدف در این مطالعه مقایسه‌ی تقارب الگوی‌های ژنتیکی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مسلول با استفاده از تکنیک MIRU-VNTR می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه، یک مطالعه‌ی توصیفی تحلیلی بود. ۱۴۰ نمونه سویه‌ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که به صورت تصادفی از بیماران مسلول که در طی سال‌های ۸۵ تا ۸۶ به بیمارستان مسیح دانشوری مراجعه کرده بودند، جداسازی شد.

تست حساسیت دارویی: افتراق گروه‌های MDR، Non MDR و حساس به داروها با استفاده از تست تناسبی صورت گرفت. در این تست به محیط کشت لونشتاین- جانسن چهار داروی اصلی خط اول [بر اساس مقاومت به ایزونیازید (۰/۲ مایکروگرم بر میلی‌لیتر)، ریفامپین (۴۰ مایکروگرم بر میلی لیتر)، استرپتومایسین (۱۰ مایکروگرم بر میلی‌لیتر) و اتامبوتول (۲ مایکروگرم بر میلی‌لیتر)] به روش تناسبی و با غلظت‌های معین افزوده شد. نتایج تست حساسیت دارویی پس از ۳۸ روز تلقیح قرائت شد. تعداد کلنی‌ها بر روی سطح محیط لونشتاین- جانسن، تعداد باسیل‌های مقاوم به دارو را مشخص می‌کرد. به عنوان مثال سویه‌های MDR (سویه‌های MDR سویه‌هایی بودند که حداقل به دو داروی خط اول ایزونیازید و ریفامپین مقاوم بودند)، سویه‌های Non MDR سویه‌های بودند که تنها به داروی ایزونیازید در خط اول مقاومت نشان دادند) سویه‌های XDR سویه‌هایی بودند که در تست حساسیت دارویی به داروهای خط اول و فلوروکینون‌ها و یکی از سه داروی آمیکاسین، کپرومایسین و کانامایسین مقاوم بودند) و در مورد سویه‌های حساس به دارو در تست حساسیت دارویی بر روی محیط لونشتاین- جانسن هیچ کلنی از باکتری مشاهده نگردید.

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج DNA: DNA به روش CTAB-Nacl جداسازی شد. به طور خلاصه یک لوپ از کلونی‌های موجود بر روی محیط‌های کشت لونشتاین- جانسن (Lowenstein – Jensen) برداشته، در داخل لوله‌ی فالکن حاوی محلول TE(1x) اضافه نمودیم. نمونه‌ها در دور ۴۵۰۰rpm برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس ۱۰۰ مایکرولیتر لیزوزیم اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس به مقدار ۷۰ مایکرولیتر SDS ۷۰ درصد و ۲/۵ مایکرولیتر Proteinas K به لوله‌ها اضافه و پس از ۱۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱۰۰ مایکرولیتر از محلول Nacl ۵ مولار و ۱۰۰ مایکرولیتر CTAB به آن‌ها اضافه گردید. در مرحله‌ی بعد به محلول رویی ۷۵۰ مایکرولیتر کلروفوم ایزوآمیل الکل اضافه شد. برای رسوب DNA از ایزوپروپانل استفاده گردید. مقدار DNA به‌دست آمده توسط اسپکتروفتومتری در جذب 280-260 اندازه‌گیری گردید (۷).

واکنش‌های زنجیره‌ای MIRU-VNTR: واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز MIRU-VNTR در یک حجم ۲۵ مایکرولیتری تشکیل گردید که ۵ مایکرولیتر از آن حاوی پرایمرهای اختصاصی می‌باشد که توسط شرکت سیناژن سنتز شده بود و در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. حجم باقی‌مانده دیگر حاوی $MgCl_2$ ۰/۷۵ میلی مولار، d NTP ۰/۵ مایکرولیتر، 10x PCR Buffer ۲/۵ مایکرولیتر و DNA Taq پلیمراز ۰/۱۵ مایکرولیتر بود. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز MIRU-VNTR در ۳۵ سیکل صورت گرفت (۸). مرحله‌ی Denaturizing به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، مرحله‌ی Extension، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و مرحله‌ی Annealing به ترتیب برای لوکوس‌های ۲، ۴، ۱۰، ۱۶، ۲۰، ۲۳، ۲۴، ۲۶، ۲۷، ۳۱، ۳۹ و ۴۰ که عبارت بودند از: ۶۱/۱، ۶۰/۶، ۶۴/۱، ۶۷/۶، ۶۴/۱، ۶۴/۳، ۶۵/۰، ۶۴/۳ ، ۵۸/۳ ، ۶۳/۰ و ۶۱/۹ به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه بود. دستگاه‌های ترموسایکلر مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز این مطالعه متعلق به شرکت‌های Astec و Tech بود.

نحوه‌ی تعیین الگوی ژنتیکی MIRU-VNTR سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس: در این مطالعه برای ریشه‌یابی منطقه‌ای سویه‌های جدا شده از بیماران، الگوی ۱۲ لوکوسی MIRU-VNTR تهیه گردید که در آن هر لوکوس بر اساس تعداد تکرار توالی MIRU برای هر سویه بر روی ژل آگاروز پروفایل اختصاصی خود را کسب کرد. به عنوان مثال برای هر سویه‌ی استاندارد H37Rv پروفایل مشخص شده به ترتیب لوکوس‌های ۲، ۴، ۱۰، ۱۶، ۲۰، ۲۳، ۲۶، ۲۷، ۳۱، ۳۹ و ۴۰ عبارت از: ۲، ۳، ۳، ۲، ۲، ۶، ۱، ۳، ۳، ۳، ۲ و ۱ بودند (جدول ۱) (۵). الگوی فامیلی سویه‌ها به وسیله‌ی برنامه‌ی نرم افزاری تحت وب MIRU-VNTR plus محاسبه گردید، الگوی ژنتیکی هر سویه به صورت جداگانه و با ID اختصاصی خود به سایت داده شد. سایت رفرانس نیز الگوی ژنتیکی دریافتی را بر اساس پارامترهای موجود در بانک اطلاعاتی خود مقایسه و آنالیز نمود.

آنالیز یافته‌ها: در این مطالعه به دلیل داشتن وسعت جغرافیایی بزرگ برای سهولت در **آنالیز** یافته‌ها و بر اساس محل سکونت بیماران، استان تهران به سه منطقه جنوبی، مرکزی و شمالی تقسیم بندی شد. منطقه‌ی جنوبی (منطقه ۳) از قسمت جنوب شهر تهران تا میدان آزادی، قسمت مرکزی (منطقه ۲) از میدان آزادی تا میدان رسالت و قسمت شمالی تهران (منطقه ۱) از میدان رسالت تا قسمت‌های شمالی تهران را شامل بود. آنالیز داده‌ها بر اساس معادلات آماری توزیع فراوانی محاسبه گردید.

یافته‌ها

پس از بررسی اطلاعات کلاسیکال اپیدمیولوژی ۱۴۰ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری

www.SID.ir

Archive of SID

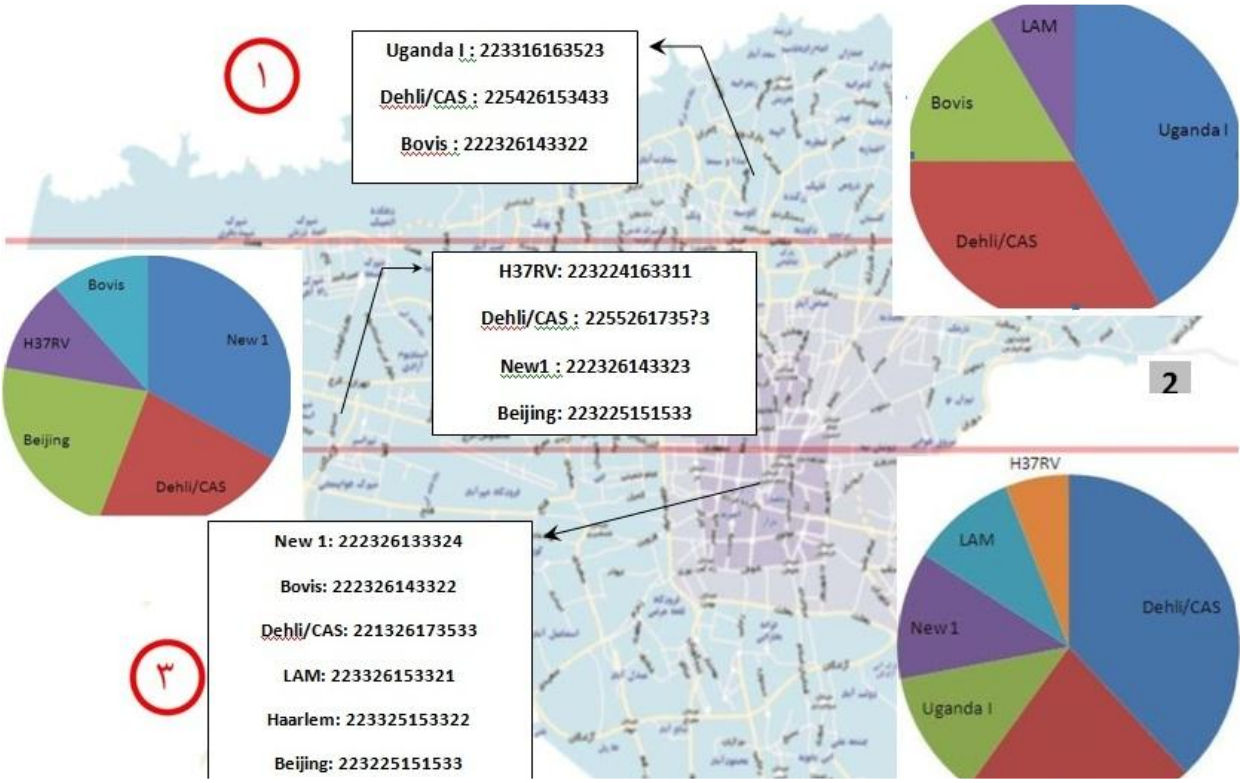
مشخص گردید که ۹۳ (۶۶/۴ درصد) مورد از بیماران را مردان و ۴۷ (۳۳/۵ درصد) مورد دیگر را زنان تشکیل دادند، همچنین از تعداد نمونه‌های مورد مطالعه قرا گرفته، ۶۶ (۴۷/۱ درصد) مورد از بیماران شهرستانی و ۷۴ (۵۲/۸ درصد) مورد دیگر بیمارانی بودند که در استان تهران سکونت داشتند. بررسی تست‌های حساسیت دارویی نشان داد که ۶۵ (۴۶/۴ درصد) مورد را سویه‌های MDR، ۲۹ (۲۰/۷ درصد) مورد Non MDR، و باقیمانده‌ی آن‌ها را سویه‌های حساس تشکیل دادند. بررسی الگوی ژنتیکی MIRU-VNTR سویه‌های جدا شده از بیماران بر اساس سایت رفرانس www.MIRU-VNTRplus.org نشان داد که خانواده Dehli/CAS با ۴۹ (۳۵ درصد) مورد و Uganda I با ۲۸ (۲۰ درصد) مورد بیشترین و خانواده‌های LAM با ۱۴ (۱۰ درصد) مورد، Beijing با ۱۴ مورد (۱۰ درصد) حدواسط و سویه‌های EAI با ۱ (۰/۷ درصد) مورد، Haarlem با ۳ (۲/۱ درصد) مورد و H37Rv با ۵ (۳/۵ درصد) مورد کمترین الگوهای ژنتیکی را به خود اختصاص داده بودند. در شکل ۱ نحوه‌ی پراکندگی، بیشترین و کمترین سویه‌ها در مناطق تهران که مورد مطالعه قرار گرفته است نشان داده شده است.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و طول توالی تکثیر شونده مطابق با سویه‌ی استاندارد H37Rv

اندازه‌ی محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز	پرایمر لوکوس‌های MIRU-VNTR	MIRU-VNTR لوکوس‌های
۵۰۸ bp	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT F TACTCGGACGCCGGCTCAAAA` R	۲
۳۵۳ bp	GCGCGAGAGCCCGAACTGC F GCGCAGCAGAAACGTCAGC R	٤
۶۴۳ bp	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC F GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT R	۱۰
۶۷۱ bp	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA F CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC R	۱۶
۵۹۱ bp	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG F GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA R	۲۰
۸۷۳ bp	CAGCGAAACGAACTGTGCTATCAC F CGTGTCCGAGCAGAAAAGGGTAT R	۲۳
۴۴۷ bp	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT F GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA R	۲٤
۶۱۴ bp	CCCGCCTTCGAAACGTCGCT F TGGACATAGGCGACCAGGCGAATA R	۲۶
۶۵۷ bp	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA F GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA R	۲۷
۶۵۱ bp	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA F GTGCCGACGTGGTCTTGAT R	۳۱
۶۴۶ bp	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC F CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT R	۳۹
۴۰۸ bp	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT F GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA R	٤۰

www.SID.ir

Archive of SID



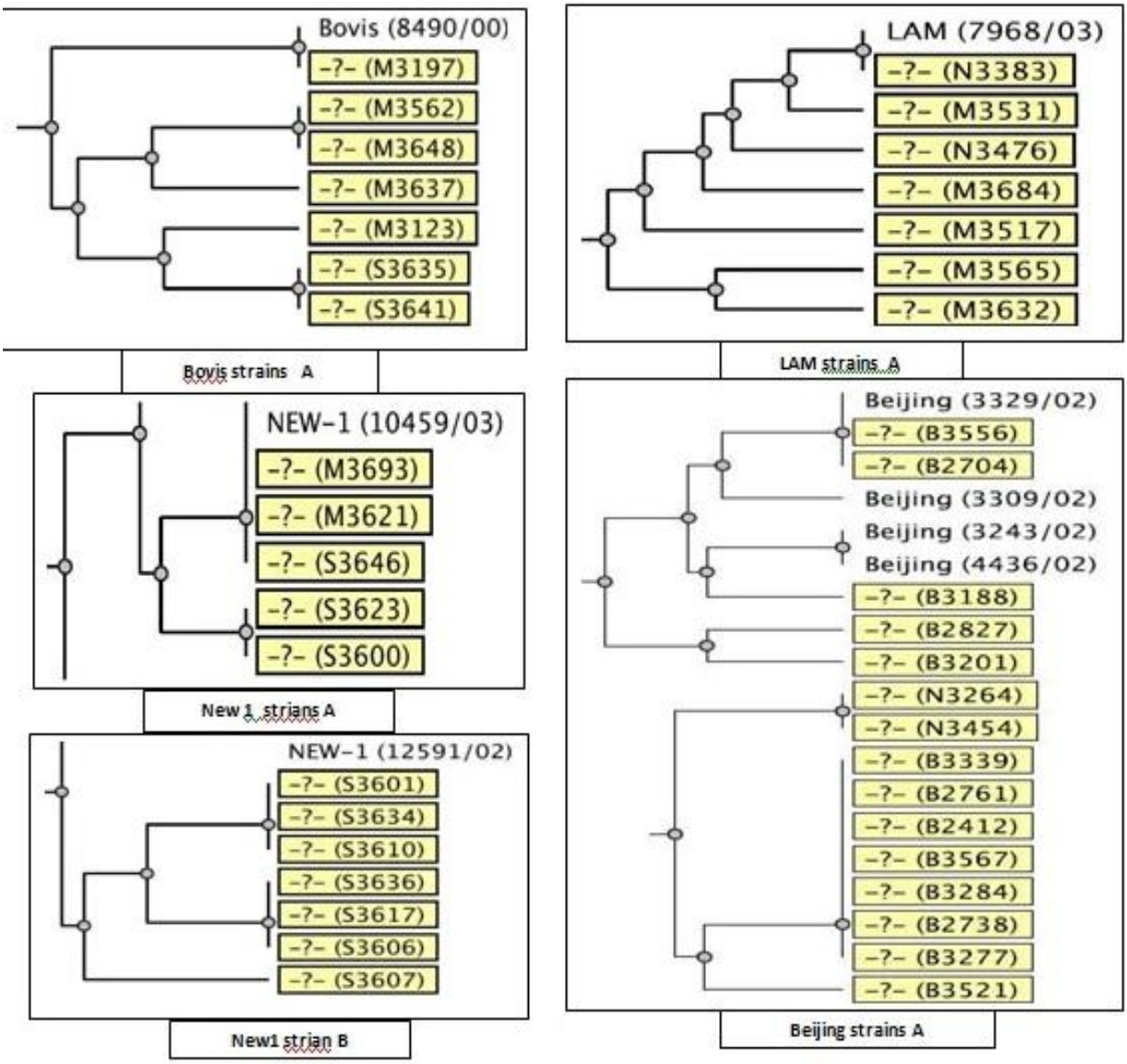
شکل ۱: نحوه‌ی پراکندگی سویه های جدا شده از بیماران و همچنین توالی ژنتیکی مشخص شده توسط سایت MIRU-VNTR plus مشخص گردیده است. در منطقه‌ی شماره ۳، تهران تعداد و تنوع پراکندگی سویه جدا شده نسبت به دو منطقه دیگر بیشتر می‌باشد و منطقه‌ی شماره ۱، کمترین تعداد تنوع سویه‌ها را نشان داده است.

سویه‌های Beijing با (۷۸/۵ درصد) و Dehli/CAS با (۷۶ درصد) بیشترین تنوع و تعداد فراوانی خانواده‌ها را در مناطق جنوبی تهران تشکیل می‌دادند. که در این میان سویه‌ی Beijing بالاترین رتبه را به خود اختصاص داده بود و خانواده‌ی Dehli/CAS دومین رتبه‌ی خانواده را در بین سویه‌ها داشت. اما در مناطق شمالی استان تهران همین سویه‌ها از تعداد و تنوع کمتری برخوردار بودند. و در این مناطق خانواده‌های (۳۵/۷ درصد) Uganda I و (۱۶ درصد) Dehli/CAS بیشترین سویه‌ها را تشکیل می‌دادند. از آنجایی‌که ۶۶ مورد از نمونه‌های مورد مطالعه قرار گرفته از بیماران شهرستانی جداسازی شده بود، بررسی و مطالعه‌ی نمونه‌های شهرستان نشان داد که ۸۴/۸ درصد از سویه‌های جدا شده از شهرستان‌ها متعلق به شهرهای مرزی و شهرهای با درصد بالای مهاجر پذیری از قبیل زابل، خوزستان، کرمانشاه، گلستان، خراسان، قم و کرج بودند. حدود ۱۰ درصد از این سویه‌ها متعلق به خانواده‌ی LAM بودند که از این تعداد ۵۰ درصد از آن‌ها از مهاجران عراقی جدا شده بود. مطابق شکل شماره‌ی ۲ قسمت سمت راست به استثنای شماره‌های ۳۳۸۳ و ۳۴۷۶ که مربوط به بیماران منطقه‌ی جنوبی تهران بود، بقیه‌ی نمونه‌ها از مهاجران عراقی جداسازی گردید. مطالعه‌ی دقیق سویه‌ی New1 نیز از قرابت فیلوژنتیکی و انتشار وسیع آن در شهرهای گلستان، فارس و

www.SID.ir

Archive of SID

تهران نشان داد (شکل شماره ۲). شماره‌های ۳۶۹۳، ۳۶۲۱ و ۳۶۴۶ با وجود قرابت فیلوژنتیکی در مناطق مختلف از کشور پراکنده شده بودند. در شکل شماره‌ی ۲ قسمت B خانواده New1 نشان داد که شماره‌های ۳۶۰۱، ۳۶۱۰ به ترتیب به مناطق مرکزی و جنوبی تهران تعلق داشتند، در صورتی‌که شماره‌ی ۳۶۳۴ از همین خانواده و با الگوی فیلوژنتیکی مشابه از بیماری در استان گلستان جداسازی شده بود و شماره‌های ۳۶۳۶، ۳۶۱۷ از مناطق جنوبی تهران، شماره‌ی ۳۶۰۶ از شهرستان زابل و شماره‌ی ۳۶۰۷ از استان کرمانشاه جداسازی شده بود. شکل ۲ مربوط به سویه‌های خانواده Beijing نشان می‌دهد که شماره‌ی ۳۵۵۶ ، ۲۷۰۴ ، ۳۲۰۱، ۲۸۲۷ که دارای الگوهای ژنتیکی متشابه‌ای هستند، از مهاجران افغان و سویه‌ی شماره‌ی ۳۱۸۸ در همین ارتباط فیلوژنتیکی از بیماری در استان خراسان جداسازی شده بود.



شکل ۲: ارتباط فیلوژنتیکی سویه‌ها و نحوه‌ی توزیع هریک از آن‌ها که با استفاده از برنامه تحت وب plus.orgwww.MIRU-VNTR رسم گردیده، در فامیلی‌های مربوط به خود نشان می دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

جداول شماره ۲: مقایسه‌ی اطلاعات کلاسیک بیماران مورد مطالعه بر اساس حساسیت دارویی، سویه‌ی تشخیص داده شده، موقعیت جغرافیایی و جنسیت

۲-۱ حساسیت دارویی:

نوع سویه‌های جدا شده بر اساس تست‌های حساسیت دارویی	تعداد و درصد سویه‌های جدا شده
MDR	**٤٦/٤ درصد) ٦٥**
Non MDR	**٢٠/٧ درصد) ٢٩**
Beijing	**١٠ درصد) ١٤**
Sensitive	**٢٢/٨ درصد) ٣٢**

۲-۲ الگوی سویه های تشخیص داده شده :

فامیلی سویه‌های جدا شده	تعداد و درصد فامیلی سویه‌های جدا شده
Dehli / CAS	**٣٥ درصد) ٤٩**
NEW 1	**١١/٤ درصد) ١٦**
Uganda 1	**٢٠ درصد) ٢٨**
LAM	**١٠ درصد) ١٤**
Bovis	**٧/١ درصد) ١٠**
Beijing	**١٠ درصد) ١٤**
H37Rv	**٣/٥ درصد) ٥**
Haarlem	**٢/١ درصد) ٣**
EAI	**٧ درصد) ١**

۲-۳ فراوانی موقعیت جغرافیایی و جنسیت بیماران:

موقعیت جغرافیائی	تعداد و درصد بیماران
شهرستان	**٤٧/٢ درصد) ٦٦**
تهران	٥٢/٨ درصد) ٧٤
جنسیت بیماران	تعداد و درصد بیماران
مردان	**٦٦/٥ درصد) ٩٣**
زنان	٣٣/٥ درصد) ٤٧

بحث

با توجه به شیوع مجدد بیماری سل و پیدایش سویه‌های فوق‌العاده مقاوم (XDR) و کاملاً مقاوم به دارو (TDR) اهمیت شناسایی این سویه‌ها را در کنترل بیماری سل، وارد مرحله‌ی تازه‌ای کرده است (۹). در این مطالعه برای تسهیل در آنالیز آماری نمونه‌ها، استان تهران به سه منطقه‌ی جنوبی (۳)، منطقه‌ی مرکزی (۲) و شمالی (۱) تقسیم گردید. در شکل ۱ نیز نشان داده شد که بیشترین تعداد و تنوع آللی سویه‌ها از مناطق جنوبی تهران جداسازی شده است، که بیشترین خانواده بر اساس سویه‌ها مربوط به سویه‌های Beijing به میزان (۴۶/۱ درصد) بود که از مهاجران افغان ساکن در این منطقه جدا شده بود. بررسی الگوهای فیلوژنتیکی نیز نشان داد که بین سویه‌های جدا شده از منطقه‌ی جنوبی تهران تشابهات زیادی با سویه‌های مهاجران افغان وجود دارد. که این نشان دهنده‌ی انتقال سویه‌های Beijing (مقاوم به دارو) از مرزهای شرقی کشور به ایران می‌باشد. در مطالعه‌ای که فرنیا و همکارانش در سال ۲۰۰۳ انجام دادند، ۵۷ درصد موارد وقوع سل در تهران را فعالیت مجدد بیماری و ۴۳ درصد را ناشی از انتشارات اخیر می‌دانند. فرنیا در مطالعات خود نشان داد که ۴۰ درصد سویه‌های Beijing جدا شده از بیماران مربوط به مهاجرین افغان می‌باشد (۱۰). در مطالعه‌ای دیگر فرنیا و همکارانش در سال ۲۰۰۸، بر روی نمونه‌های Beijing ایران و کشور افغانستان، اختلاف چندانی در لوکوس‌های VNTR مورد مطالعه نیافتند (۱۱). در این مطالعه نیز تفاوت آشکاری در پروفایل‌های آللی لوکوس‌های MIRU-VNTR در خانواده‌های Beijing مشاهده نگردید. در مطالعه‌ای هم که توسط اصغرزاده و همکارانش در منطقه‌ی شمال شرق ایران و بین بیماران ایرانی (آذربایجان) و نخجوانی انجام داد، به وجود الگوهای پروفایلی متشابه بین بیماران در مطالعات خود اشاره کردند که نزدیکی بین این دو منطقه و رفت و آمدهای صورت گرفته

www.SID.ir

Archive of SID

می‌تواند باعث انتشار سویه‌ها در دو منطقه گردد (۱۲). در قسمت دیگر از مطالعه بررسی سویه‌های خانواده‌ی LAM نشان داد که قسمتی از این سویه‌ها از مهاجران عراقی و قسمت دیگر از بیماران ساکن در منطقه‌ی جنوبی تهران جداسازی شد. بررسی دقیق‌تر موقعیت جغرافیایی بیماران نشان داد که برخی از این بیماران از شهرهای مرزی و مهاجرپذیر مانند کرمانشاه و قم بودند. ردیابی سویه‌های LAM نشان دهنده‌ی انتقال این سویه‌ها از مرزهای غربی کشور به ایران می‌باشد. در قسمت دیگر از همین سویه‌های خانواده (LAM) ارتباط فیلوژنتیکی و موقعیت جغرافیایی نمونه‌ها نشان از ارتباط نزدیک سه نمونه از سویه‌های خانواده LAM در موقعیت‌های جغرافیایی متفاوت بود، نمونه‌ی شماره‌ی ۳۱۱۸ که از یک بیمار در منطقه‌ی جنوبی تهران جداسازی شده، با شماره‌ی ۳۱۲۹ در منطقه‌ی کرمانشاه و نمونه‌ی شماره ۳۶۸۵ که از مهاجر عراقی جداسازی شده بود، گزارش گردید. در شکل ۲ قسمت سمت چپ بالای تصویر (خانواده‌ی Bovis) با بررسی اطلاعات کلاسیکال اپیدمیولوژی این سویه‌ها مشخص گردید، نمونه‌های شماره‌ی ۳۵۶۲ و ۳۶۴۸ که ارتباط فیلوژنتیکی زیادی به همدیگر دارند، از منطقه کردستان عراق جداسازی شده بودند، در حالی‌که شماره‌ی ۳۶۳۷ از منطقه‌ی کرمانشاه و شماره‌های ۳۶۳۵، ۳۶۴۱ و ۳۱۹۷ از بیماران شهرستانی و شماره‌ی ۳۱۲۳ از بیماری در منطقه‌ی شیراز جداسازی شده بود. بررسی ردیابی این بیماران و تشابهات الگوهای ژنتیکی از نفوذ این سویه‌ها به داخل کشور اشاره داشت. در شکل ۲ سویه‌های خانواده NEW1 قسمت A,B نشان از تقارب بالای الگوی فیلوژنتیکی این سویه‌ها داشت. بررسی موقعیت جغرافیایی سویه‌هایNEW1 نشان داد که بیش از (۷۰ درصد) از این سویه‌ها از مناطق جنوبی و مرکزی استان تهران جداسازی شده بودند. جداسازی سویه‌های با الگوی ژنتیکی متشابه، از مناطق جغرافیایی نزدیک به هم نشان دهنده‌ی اشتراک منابع آلودگی در بین بیماران بود. والچوا در مطالعه‌ی خود در سال ۲۰۰۶ از مناطق مختلف بلغارستان با استفاده از تکنیک Spoligotyping وجود ۵ پروفایل اختصاصی و ۱۵ پروفایل مشترک را در بین نمونه‌های مورد مطالعه خود نشان داد. همچنین وی به وجود خانواده های مشترک T_1 و H_3 که در کشورهای همسایه (رومانی، ترکیه، یونان و روسیه) جدا شده بودند، اشاره کرد (۱۳). در مطالعه‌ای که ساپلی و همکارانش بر روی ۹۰ سویه‌ای که از ۳۸ کشور جمع‌آوری شده بود، انجام دادند، به جداسازی خانواده‌های CAS، LAM، Ghana، Uganda I، Haarlem، Bovis و Beijing در بین نمونه‌های خود اشاره کردند. در این مطالعه نیز از بین نمونه‌های که از استان تهران و شهرستان‌ها جداسازی شد خانواده‌های Dehli/CAS، Uganda I، New I، EAI، Haarlem، H37Rv جداسازی گردید (۱۴). در مطالعه‌ای هم که توسط ماس و همکارانش در کشور ونزوئلا صورت گرفت، از روش‌های متفاوتی استفاده کردند. به‌طوری‌که وقتی از تکنیک ۱۲ لوکوسی MIRU-VNTR به تنهایی استفاده کردند، تنها ۱۵ ژنوتیپ در ۷ سویه‌ی اختصاصی تشخیص داده بودند. اما هنگامی که از تکنیک‌های ترکیبی ۱۵ لوکوسی MIRU-VNTR و Spoligotyping و در قسمت بعدی از ۲۴ لوکوس MIRU-VNTR و Spoligotyping استفاده کردند، به ترتیب (۲۰ ژنوتیپ در ۱۱ سویه) و (۲۱ ژنوتیپ در ۱۱ سویه) تشخیص داده بودند، به‌طوری‌که HGI دو روش آخر از ۸۷ درصد به ۹۵ درصد افزایش یافته بود. ماس در مطالعات خود تکنیک‌های ترکیبی ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR به همراه Spoligotyping و یا تکنیک ۲۴ لوکوسی MIRU-VNTR را به عنوان استانداردهای طلایی برای مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی در منطقه Warao می‌داند (۱۵). در مطالعه‌ای هم که توسط جعفریان و همکارانش در دو مرحله بر روی نمونه‌های بیماران مسلول صورت گرفت، در مرحله‌ی اول با استفاده از تکنیک

www.SID.ir

Archive of SID

MIRU-VNTR، ۲۳ نمونه تعیین هویت نگردید. در حالی‌که در مرحله‌ی دوم با استفاده از تکنیک Spoligotyping و MIRU-VNTR تنها ۹ مورد از سویه‌ها تعیین هویت نگردید (۱۶). در مطالعه‌ای هم که توسط میرسعیدی و همکارانش در سال ۲۰۰۲ صورت گرفت یکی از دلایل اصلی وجود سل مقاوم را همجواری کشور ایران با همسایگان پر خطر دانست (۱۷). سازمان جهانی بهداشت وقوع سل در ایران را ۵۲ مورد به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ نفر اعلام نمود. این در حالی است که وقوع سل در کشور افغانستان ۳۱۴ مورد به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است. در ادامه‌ی همین گزارش در سال ۲۰۰۸ کشور افغانستان با ۲۸۳۰۱، عراق با ۹۲۸۰ ، سودان با ۲۵۴۴۴، عربستان سعودی با ۴۰۶۴ و پاکستان با ۲۴۸۱۱۵مورد اسمیر مثبت گزارش شده بود. کشور پاکستان در بین ۸ کشور شایع بیماری سل در جهان قرار دارد و از جمله کشورهایی است که مقادیر بالای سویه‌های MDR در آن گزارش شده است (۱۸). بنابراین کشور ایران به دلیل نفوذپذیری بالای مهاجران و تجمع آن‌ها در مناطق مرزی و در شهرهای بزرگ و وجود فاکتورهای خطر ساز دیگر از قبیل تراکم بالای جمعیتی و فقر بهداشتی، منطقه‌ی استراتژیک برای جلوگیری از انتشار و انتقال سل در منطقه محسوب می‌شود. قرابت بالای الگوی‌های ژنتیکی از بیماران متعلق به شهرهای مرزی با سویه‌های جدا شده از بیماران کشورهای همسایه این نظریه را تایید می‌کند. بنابراین با به کار بردن تکنیک‌های بیشتر از قبیل RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)، Spoligotyping، بررسی SNP (Single Nucleotide polymorphism) ها و یا توالی‌های حذفی (Deletion Repeat =DR) سویه‌های مایکوباکتریوم با قاطعیت بیشتری می‌توان الگوی ژنتیکی سویه‌ها و نحوه‌ی انتشار آلودگی و بررسی فاکتورهای خطرساز در یک منطقه‌ی جغرافیایی را مورد مطالعه قرار داد.

نتیجه گیری

با توجه به شیوع مجدد بیماری سل و پیدایش سویه‌های فوق‌العاده مقاوم (XDR) و کاملاً مقاوم به دارو (TDR) اهمیت شناسایی این سویه‌ها را در کنترل بیماری سل، وارد مرحله‌ی تازه‌ای کرده است. تقارب بالای الگوهای ژنتیکی سویه‌های جدا شده در مناطق مرزی کشور با نمونه‌های جدا شده در داخل کشور و همچنین منطقه‌ی جنوبی شهر تهران، از وجود منابع مشترک آلوده در این مناطق حکایت دارد. به همین خاطر پیشنهاد می‌شود برای کنترل و پیشگیری از انتشار سویه‌های مقاوم کشورهای همسایه بایستی با نظارت بیشتر و اعمال سیاست‌های بهداشتی و کنترل دقیق مناطق پرخطر همچون سال‌های گذشته نقش ارزنده‌تری را در این زمینه اعمال نمایند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل تلاش همکاران محترم بخش اپیدمیولوژی مولکولی و بخش روتین رفرانس سل کشوری مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی بیمارستان مسیح دانشوری می‌باشد که از این عزیزان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1- Masjedi MR, Farnia P, Sorooch S, et al. Extensively Drug- Resistant Tuberculosis 2 years of surveillance in Iran. *Clin Infec Dis*. 2006; 43: 841-7.

2- Van soolingen D. Molecular epidemiology of

www.SID.ir

tuberculosis and other mycobacterial infection, main methodologics and achievements. *J Intern Med.* 2001; 249: 1-26.

3- Marhema B, Kurepina N, Bifani P, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis: Current insights. *J Clin Microbiol*. 2006; 19: 658-85.

4- Mazars E, Lesjean S, Banul L, et al. High resolution minisatellite- based typing as a portable approach to global analysis of *mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Natl Acd Sci*. 2001; 98: 1901-6.

5- Supply P, Lesjean E, Savine K, et al. Automated high-throughput genotyping for the study of global epidemiology of *mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive unit. *J Clin Microbial.* 2001; 39: 3563-71.

6- Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al. Variable human minisatellite- like regions in the *mycobacterium tuberculosis* genoms. *J Molecular Microbiol.* 2000; 36: 762-71.

7- Goyal M, Saunders N, Van Embeden AD, et al. Differentiation of *mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin M.* 1997; 10: 647-651.

8- Cowan L, Mosher L, Diem L, Massey P, et al. Variable –Number Tandem Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolate with copy number of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive unit. *J Clin Microbial.* 2005; 43: 688-95.

9- Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, et al. Emergence of new forms of totally drug resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug resistant tuberculosis or totally drug resistant strains in Iran. *Chest.* 2009; 136: 420-5.

10- Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, et al. Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: using RFLP and Spoligotyping methods. *J Infection.* 2004; 49: 94-101.

11- Farnia P, Tajadin A, Kargar M, et al. Assessment of genetic pattern of mycobacterium TB isolated from Iranian and Afghan TB patients by means of VNTR typing. *J Kurdistan Uni Med Sci.* 2008; 13: 53-61.

12- Asgharzadeh M, Khakpour M, Kafil HS, et al. Use of mycobacterial interspersed repetitive unit – variable –number tandem repeat typing to study *mycbacterium tuberculosis* isolates from east Azarbaijan province of Iran. *Pakistan J Biol Sci*. 2007; 10: 3769-77.

13- Valcheva V, Mokrousov I, Rastogi N, et al. Molecular Characterization of *mycobacterium tuberculosis* isolates from different regions of Bulgaria. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 1014-18.

14- Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable –number tandem repeat typing of *mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol.* 2006; 44: 4498-510.

15- Maes M, Kremer K, Van soolingen D, et al.

24- Locus MIRU-VNTR genotyping is a useful

www.SID.ir

Archive of SID

tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. *J Tuberculosis.* 2008; 88: 490-4.

16- Jafarian M, Aghali-Merza M, Farnia M, et al. Synchronous comparison of *mycobacterium tuberculosis* epidemiology strains by 'MIRU-VNTR' and 'MIRU-VNTR and spoligotyping' technique. *J Avicenna Med Biotchnol.* 2010; 2: 145-152.

17- Mirsaeidi M, Tabarsi P, Khoshnood K, et al. Treatment of multiple drug-resistant tuberculosis (MDR-TB) in Iran. *J Infect Dis.* 2005; 9: 317-322.

18- Farnia P, Masjedi MR, Varahram M, et al. The recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* strains among Iranian and Afghan relapse case: a DNA fingerprinting using RFLP and spoligotyping. *BMC infect DIS.* 2008; 8: 109-16.

www.SID.ir

Comparison of the Genetic Convergence Degree of Mycobacterium Tuberculosis (TB) Strains Isolated from Patients Infected with TB by MIRU-VNTR Technique

Jafarian M[1], Farnia P[2], Mozafari M[3], Ahmadi M[2], Masjiedi MR[4], Velayati AA[4]

[1]Islamic Azad University, Jahrom Branch, The Research Center of Mycobacteriology, Jahrom, Iran

[2]Mycobacteriology Research Center , Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[3]Qom Azad University of Medical Sciences, Qom, Iran

[4]The Research Center of TB and Lung Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences. Tehran, Iran

Corresponding Author: Jafarian M, Mycobacteriology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

E-mail: mehdijafariandormency@gmail.com

Received: 12 Jun 2010 **Accepted:** 17 Jan 2011

Background and Objective: In recent decades, epidemiology has significantly been considered in hygienic studies and disease control, and has made a way into all the programs and hygiene policies. By examining the convergence of harmful lineage genetic patterns, the common infectious resources among the patients can be inferred. The purpose of this study was to compare the *Mycobacterium Tuberculosis* genetic patterns convergence isolated from patients infected with *Mycobacterium Tuberculosis* by MIRU-VNTR technique.

Materials and Methods: After isolation the samples from Lowenstein Jensen culture environment and taking segregate tests and drug susceptibility, the DNA was extracted using CTAB/Nacl technique. The genetic patterns of lineages were calculated according to 12 loci format with MIRU-VNTR technique. Demographic and molecular information of patients was used for epidemiological purposes.

Results: After performing drug sensitivity test, 65/140 (64/4%) samples fall into MDR, 29 (20/7%) samples in non MDR category, and the rest of them were among drug – sensitive lineages. Lineage genetic pattern analysis indicated that 49 (35%) of samples related to Delhi/CAS, 28 (20%) to Uganda I, 16 (11/4%) to New I, 1 (0.7%) to EAI, 3(2/1%) to Haarlem, and 5(3/5%) to H37RV families.

Conclusion: The genetic pattern convergence comparison exhibited that the most common and variant genetic patterns was seen in Tehran province which were mostly connected to south (from the South of Tehran to Azadi Square) and to the border cities neighboring Afghanistan, Iraq, Turkmenistan and cities with extreme percentage of immigration, all of which signified shared polluted resources among patients.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, MIRU-VNTR, Epidemiology

www.SID.ir